

## 卵黄 Vitellin に関する研究 (第1報)

## Vitellin のアミノ酸組成について

安 福 英 子\* 木 戸 詔 子\*

## Studies on the Vitellin of Yolk (Part 1)

## On the Amino Acid Composition of Vitellin

Hideko Yasufuku Syoko Kido

## I. 緒 言

卵黄のリンたんぱく質としては、リポたんぱく質より脂質を除いて得られる Vitellin, Vitellenin と10%の高含量にリンを含む Phosvitin が5:3:2の割合で存在している。しかし、これらの個々のたんぱく質、あるいは相互関係についてはまだ明確でない点が多い。

卵黄の主たんぱく質である Vitellin に関する研究は1867年 Hoppe-Soyler<sup>1)</sup>によりリポたんぱく質であることが明らかにされ、このリポたんぱく質からアルコールで脂質を除くと、中性塩があっても溶解しなくなるという性質をもっている。

Vitellin は中性では溶けないためか、その理化学的性質の研究はあまりされていない。アミノ酸組成については1950年 Lewis<sup>2)</sup>らが、18時間、加水分解したものについて微生物法により定量している。リンの結合位置および構造に関しては、Levene<sup>3)</sup>, Rapoport<sup>4)</sup>らにより Vitellin の分解生成物よりセリンとリンの結合が報告されている。

そこでわれわれは、近年クロマトグラフィーの著しい発展にともない、アミノ酸の微量分析が可能となったので、Vitellin のアミノ酸組成をアミノ酸自動分析器を用いて定量し、また、酸分解による時間的変化の検討を行なった結果、セリンのリン酸エステルであるホスホセリンを定量することができ、他のアミノ酸についてもかなりの差を認めたので報告する。

## II. 実 験 の 部

## II-I. 実験の方法

## II-I-I. 試料の調整

Osborne, Campbell<sup>5)</sup>らの方法により、鶏卵シェーバースタークロス 288 号の卵黄を、卵黄膜を破らないようにして蒸留水で卵白をよく洗い去り、卵黄に等量の10%-NaClを加えてよく混合した後、エーテルを重層し、かくはんして一夜放置する。エーテルに可溶性遊離の脂質を、エーテル層が無色になるまでエーテルを取替えてかくはんする。次に卵黄膜やカラザなどの不溶物を除き、3倍量の水で希釈し、水で透析を行なうと白色の沈殿を生じた。これを1N-NaClに溶解し再び透析することを数回繰り返すことにより Lipovitellin を得た。この Lipovitellin に80%アルコールを加え50°Cに加温し、溶解してくる脂質を、アルコールを取替えて完全に除去し、さらに蒸留水、エーテルでよく洗浄した後、真空乾燥を行ない白色粉末の Vitellin を得た。この Vitellin を定量測定に使用する場合は、アプデルハルデンにて乾燥したものを試料とした。

## II-I-II Vitellin の純度検定

上記の方法で得た Vitellin の純度検定を次に示すように電気泳動、カラムクロマトグラフィーにより行なった。

## 1) Disc 電気泳動

エスエム機器製 Disc 電気泳動装置8型を使用し、永井氏の方法により、pH 10.0 のグリシン緩衝液に100~300 $\mu$ mol に溶解した Vitellin を

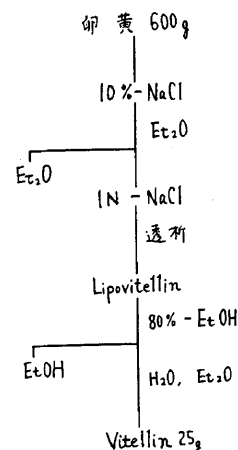


図1 試料の調整

\* 本学食品化学研究室

pH 9.4ゲルを用い、濃縮用ゲルに達するまでは1本当たり2mA、それ以後は5mA で80分泳動を行なった。同時に卵黄を 1N-NaCl に溶かしたものを比較対照として行なった。その泳動は図2のようなパターンを示し、Vitellin は1つのバンドを認めた。

## 2) セファデックスカラムクロマトグラフィー

4-250 ユニバーサルスペクトアナライザーを使用して、Vitellin を pH 11.0 の炭酸ナトリウム・重炭酸ナトリウム緩衝液で溶かし、さらに等量の 8 M の尿素を加えて完全に溶解し、同緩衝液で透析し、尿素を除去した後、Sephadex G-100 を用いて、260m $\mu$  の吸収より図3のクロマトグラムを得た。

## 3) Tiselius の電気泳動

HTB-2 型日立 Tiselius 装置を用い、Vitellin を pH 10.0 のグリシン緩衝液に1%濃度に溶解し、同緩衝

Vitellin

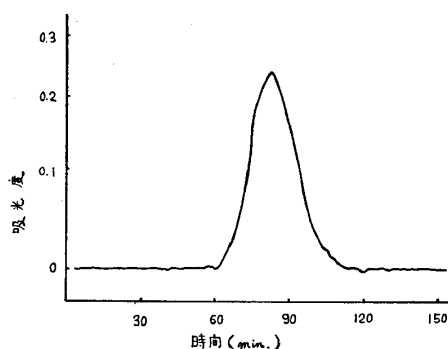


Yolk



泳動条件：ポリアクリルアミド、9.4ゲル、1本当たり5mA、80min、試料たんぱく濃度300 $\mu$ mol

図2 Disc の電気泳動



Sephadex : G-100, カラム : 2.2 $\times$ 20cm  
流速 : 18ml/hr. 緩衝液 : 0.1M-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>(pH11.0)  
試料 : Vitellin 1.5mg(0.2ml)

図3 セファデックスカラムクロマトグラフィー



緩衝液 : pH10.0グリシン緩衝液(イオン強度 0.1)  
透析 : 5 $^{\circ}$ C, 24hr. 泳動 : 5 $^{\circ}$ C, 65V, 60min.  
試料 : 1%たんぱく濃度

図4 Tiselius の電気泳動

液で 1.5A, 60分泳動を行ない、図4に示すような泳動図を得た。

以上のごとく、電気泳動、カラムクロマトグラフィーにより、われわれの得た Vitellin は、ほぼ均一であると考えられたので、これを試料としてアミノ酸組成を検討した。なお、窒素とリンの定量を、マイクロビュレット法と Fiske-Subbarow 法で行なった結果、その組成は窒素 15.8%, リン 1.2%, 窒素とリンの比は13.2となった。

## II-I-III Vitellin のアミノ酸組成

### 1) Vitellin の加水分解

Vitellin 10mg を 500倍量の 6N-HCl に溶解し、減圧脱気後封管し、分解炉で110 $^{\circ}$ Cに加熱し、8 $\cdot$ 24 $\cdot$ 48 $\cdot$ 72時間分解したものを、減圧アルカリデシケーター中で HCl を除去し、pH 2.2 の希釈用クエン酸緩衝液で 10ml に定容して冷凍保存し、試料とした。

表1 Vitellin の酸分解時間によるアミノ酸の変化  
( $\mu$ mol/g Vitellin)

アミノ酸	8 hr.	24 hr.	48 hr.	72 hr.
Lys.	546	661 *	536	591
His.	172	211 *	174	192
NH <sub>3</sub>	659 *	861	874	1003
Arg.	457	567 *	456	482
P-Ser.	67	48	40	36
Cys-Cys	95	62	34	15
Asp.	740 *	668	701	753
Thr.	437 *	379	397	412
Ser.	865	732	727	700
Glu.	781 *	716	777	826
Pro.	429	326	379	365
Gly.	407 *	341	377	396
Ala.	612 *	554	602	637
Val.	435	448	525 *	456
Met.	224	159	190	142
Ileu.	440	393	513 *	484
Leu.	749 *	632	743	723
Tyr.	269 *	228	238	232
Phe.	296 *	237	262	284

この表の数値は窒素に対する各の加水分解時間のアミノ酸の回収率で換算したものを Vitellin 1g に対する  $\mu$ mol 数で表わしたもので、3回の平均値を示した。

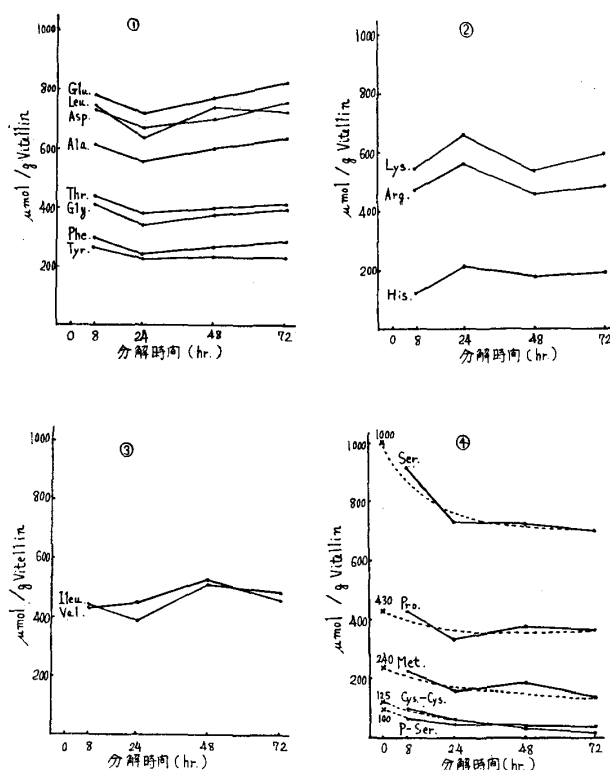
\* 個個のアミノ酸の分解時間による変化を検討し、この値を Vitellin 中のアミノ酸含量とした。\* のついていないものは外そう法により 0 時間の値をとった。

## 2) アミノ酸の定量

日立 KLA-3B 形アミノ酸自動分析器にて、アミノックスA-4を用いて定量を行なった。塩基性アミノ酸は $0.9 \times 10\text{cm}$ カラムを使用し、中酸性アミノ酸は $0.9 \times 50\text{cm}$ カラムを使用して Vitellin  $0.5\text{mg}$ に相当する $0.5\text{ml}$ をチャージし、カラム温度 $55^\circ\text{C}$ 、流速は緩衝液 $60\text{ml/hr}$ 、ニンヒドリン $30\text{ml/hr}$ 、 $10\text{cm}$ カラムは $\text{pH} 5.50$ クエン酸緩衝液で1時間分析、 $50\text{cm}$ カラムは $\text{pH} 3.25$ クエン酸緩衝液 ( $\text{HCl } 4\text{ml/l}$ , アルコール  $50\text{ml/l}$  を加えて使用),  $\text{pH} 4.25$ クエン酸緩衝液で3時間分析を行ない定量した。なお、シスチンは過ギ酸酸化法によりシスチン酸として定量した。また、トリプトファンは、アルデヒド法により比色定量を行なった。

## 3) Vitellin の各アミノ酸の酸分解による時間的变化

Vitellin 中のアミノ酸組成を定量するのに、各アミノ酸の定量に適した分解時間を見つけるのは非常に困難で不可能に近い。通常、たんぱく質分解時間は24時間といわれているが、カゼインやグルテンなどのたんぱく質は48時間といわれているので、 $8 \cdot 24 \cdot 48 \cdot 72$ 時間分解したものを定量した。Vitellin 中の各アミノ酸の酸分解による時間的变化を表1および図5に示



①は8時間、②は24時間、③は48時間、④は外そう法により0時間の値を Vitellin 中のアミノ酸含量とした。

図5 Vitellin の酸分解による各アミノ酸の変化

す。各のデーターは窒素に対するアミノ酸の回収率で換算したものを Vitellin  $1\text{g}$  に対する  $\mu\text{mol}$  で表わしたもので、3回の平均値をとったものである。

## 4) Vitellin のアミノ酸組成

各アミノ酸の分解より適当と考えられる最高値の分解時間の値 (表1\*) をとり、また、ホスホセリン、シスチン酸、セリン、プロリン、メチオニンについては分解時間が長くなるにしたがって減少しているので図5—④に示すように外そう法により0時間の値をとり、たんぱく質  $100\text{g}$  中のアミノ酸のg数に表わしたものを表2に示し、Lewis らの測定値と比較検討を行なった。

## II-II 実験結果および考察

## 1) Vitellin のアミノ酸組成

Lewis らとわれわれの分析法とは異なっており、アミノ酸組成を比較検討を行なうことにはいろいろの問題があり、また、単一たんぱく質としての Vitellin そ

表2 Vitellin のアミノ酸組成  
(g/100g Vitellin)

アミノ酸	著 者		J. C. Lewis	
	N	15.8%	N	15.7%
	P	1.2%	P	2.2%
	A	B	A	B
Try.	1.3	1.2	1.1	1.0
Lys.	9.7	8.5	6.9	6.1
His.	3.3	2.9	3.0	2.7
NH <sub>3</sub>	1.1		1.3	
Arg.	9.8	8.9	8.4	7.5
P-Ser.	1.9	1.7		
Asp.	9.9	8.6	8.1	7.0
Thr.	4.9	4.1	4.7	4.0
Ser.	10.5	8.8	11.2	9.3
Glu.	11.5	10.2	11.0	9.7
Pro.	5.0	4.2	4.4	3.7
Gly.	3.1	2.4	2.8	2.1
Ala.	5.4	4.4	4.0	3.2
Cys.	1.5	1.3	1.5	1.3
Val.	6.2	5.3	6.2	5.3
Met.	3.5	3.2	2.8	2.5
Ileu.	6.7	5.9	5.3	4.6
Leu.	9.8	8.6	8.6	7.4
Tyr.	4.9	4.4	3.8	3.4
Phe.	4.9	4.4	4.0	3.6
合 計	114.9	99.0	99.1	84.4

A: たんぱく質  $100\text{g}$  に対するアミノ酸のg数

B: たんぱく質  $100\text{g}$  中のアミノ酸残基に対するg数

のものにも問題があるが、たんぱく質 100 g 中のアミノ酸残基に対する g 数で表わした値(表 2 (B)算出法)は、分析法および全窒素含量の数値が正しければちょうど 100 になるはずである。そこで Lewis らの値と比較する場合、Vitellin 中のアミノ酸の相互の比率は変らないから、表 2 以外のアミノ酸は含まれてないものとするれば、Lewis らの分析した回収率は 84.4%，われわれの場合は 99.0% となったので、この回収率より各アミノ酸の分析値を補正して、両者を 100 とすると、各アミノ酸含量は表 3 に示すように、Lewis らの分析値に対しリジン 19.0%，セリン 19.3%，アラニン 17.2% と大きな差を示し、次いで 10% 以上のものが、スレオニン、グルタミン酸、シスチン、バリン、チロシンとなった。

次に、各アミノ酸の分析値（以下に示すアミノ酸含量は表 2 (B)算出法による）を比較してみると、トリプトファンについては、Lewis らはアルデヒド法で 12 時間の値をとり 1.0 g と報告しているが、われわれは 3 時間から 24 時間の実験値より 12 時間では同じく 1.0 g となったが、6 時間で最高値を示し 1.1 g となった。

リジンは 2.4 g の最も大きな差を生じたが、これは図 5—②のごとく 24 時間で急に分解値が大きくなっているため分解時間の違いによることが大きく原因しているのではないかと考える。

表 3 Vitellin 中の全アミノ酸量を  
100 g とした各アミノ酸の比率 (%)

アミノ酸	著者	J. C. Lewis	両者の差 (J.C.lewisの値) に対する %)
Try.	1. 21	1. 18	0. 03 (2.5)
Lys.	8. 59	7. 22	1. 37 (19.0)
His.	2. 93	3. 19	0. 26 (8.2)
Ary.	8. 99	8. 88	0. 11 (1.2)
P-Ser.	1. 72		
Asp.	8. 69	8. 29	0. 40 (4.8)
The.	4. 14	4. 73	0. 59 (12.5)
Ser.	8. 89	11. 01	2. 12 (19.3)
Glu.	10. 30	11. 49	1. 19 (10.4)
Pro.	4. 24	4. 38	0. 14 (3.2)
Gly.	2. 42	2. 48	0. 06 (2.4)
Ala.	4. 44	3. 79	0. 65 (17.2)
Cys.	1. 31	1. 54	0. 23 (14.9)
Val.	5. 35	6. 27	0. 92 (14.7)
Met.	3. 23	2. 96	0. 27 (9.1)
Ileu.	5. 96	5. 45	0. 51 (9.4)
Leu.	8. 69	8. 76	0. 07 (0.8)
Tyr.	4. 44	4. 02	0. 42 (10.4)
Phe.	4. 44	4. 26	0. 18 (4.2)

アルギニンについても同様のことが考えられ、ヒスチジンの差も、リジン、アルギニンほどの差はないが同じ傾向が見られる。

セリンについては、酸と加熱するだけで徐々に分解<sup>7)8)9)</sup>し、この分解は約 10% とされ、種類のたんぱく質のセリン含量にはこの補正が施されている。<sup>8)10)11)</sup> Lewis らも 10% の補正を加えているが、われわれはセリンについては前述のごとく外そう法による値をとったが、8 時間の測定値をとり 10% 増の補正を加えた値を算出すると 8.4 g となりその差はさらに大きくなる。また、カゼイン中のセリンのようにリン酸エステル結合<sup>7)12)</sup>をしているものではさらに分解が進むといわれているので、実際にはもう少し多く含まれているものと考えられる。なお、セリンについては全アミノ酸を通じて低い値を得たが、これはセリンとは別にセリンとリン酸エステル結合したホスホセリンを別に定量することができたからであろうと考える。

スレオニンについては、セリンと同様 5% 分解<sup>11)</sup>するといわれているが、一般にはセリンのように補正值はとられていない。

アスパラギン酸、スレオニン、グルタミン酸、グリシン、アラニン、ロイシン、チロシン、フェニールアラニンは表 2 のごとく 0.1 g ~ 1.6 g 多い値を示したが、これは図 5—①のごとく、24 時間にかけて減少の傾向が見られ、フェニールアラニンも酸加水分解中に約 5% 分解<sup>13)</sup>するといわれ、チロシンも分解が認められていることから、Lewis らの測定値は 18 時間酸分解による分析値であるので、分解時間に一因があると考えられる。

プロリン、メチオニンについても同様のことが考えられる。以上の結果より、たんぱく質のアミノ酸組成を定量する場合は、各アミノ酸の定量に適した分解時間を見つけることは非常に困難ではあるが、各アミノ酸について検討し、表 1 のごとく適当と考えられる分解時間の値をとることにより、99.0% の高い回収率を得ることができた。

### III. 要 約

Vitellin のアミノ酸組成をアミノ酸自動分析器を用い、各アミノ酸の酸分解時間による変化を定量し、次の結果を得た。

(1)セリンとリン酸エステル結合したホスホセリンとして定量することができた。(ホスホセリン<sup>15)</sup>の分離、同定ならびに定量値については第 2 報に述べる)

(2)各アミノ酸の酸分解時間による変化を検討し、アスパラギン酸、スレオニン、グルタミン酸、グルシン、

アラニン, ロイシン, チロシン, フェニールアラニンについては8時間, リジン, ヒスチジン, アルギニンは24時間, バリン, イソロイシンは48時間, ホスホセリン, シスチン, セリン, プロリン, メチオニンは外そう法により0時間の分解値をとり, 99.0%の高い回収率を得ることができた。さらに, ホスホセリンなどの測定方法を検討することにより, ほぼ100%の回収率が得られると考えられる。

以上のアミノ酸組成より, Vitellin のプロテンスコアは, 第一制限アミノ酸はトリプトファンで90.1となり, 食品として栄養学上良質のたんぱく質である。

また, 卵黄中のリンたんぱく質である Vitellin 中のホスホセリンの存在は, ふ化に際して何らかの重要な役割りを果していると考えられ, その生化学的意義について検討する必要がある。

本研究結果の概要は第22回, 日本栄養食糧学会総会において発表した。

#### 参 考 文 献

- 1) G. F. K. Hoppe-Seyler, Med. Chem. Untersuch., **2**, 215 (1867)
- 2) J. C. Lewis, N. S. Snell, D. J. Hirshmann, H. Fraenkel-Cornat, J. Biol. Chem., **186**, 23 (1950)
- 3) P. A. Levene, A. Schormüller, J. Biol. Chem., **103**, 537 (1933)
- 4) S. Rapoport, Biochem. Z., **289**, 420 (1936~1937)
- 5) T. B. Osborne, G. E. Campbell, J. Am. Chem. Soc., **22**, 413, 422 (1900)
- 6) 永井裕, 蛋白質・核酸・酵素, **11**, 744, 818 (1965)
- 7) M. Damodaran, B. V. Ramachandran, Biochem. J., **35**, 122 (1941)
- 8) M. J. Boyd, M. A. Logan, J. Biol. Chem., **146**, 276 (1942)
- 9) E. Abderhalden, F. Broich, Biochem. Z., **262**, 321 (1933)
- 10) A. H. Gordon, A. J. P. Martin, R. L. M. Synge, Biochem. J., **35**, 1369 (1941)
- 11) M. W. Rees, Biochem. J., **40**, 632 (1946)
- 12) S. Posternack, T. Posternak, Compt. rend., **187**, 313 (1928)
- 13) G. L. Foster, J. Biol. Chem., **159**, 431 (1945)
- 14) S. Akabori, K. Ohno, Proc. Japan Acad., **26**, 39 (1950)
- 15) 安福, 木戸, 本誌, **26** 32 (1971)